

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14957

研究課題名（和文）キレート形成による薬物相互作用に関する新規機序の解明と金属吸収亢進のリスクの検討

研究課題名（英文）The evaluation of risk of increased metal absorption and elucidation of novel mechanism associated with the drug-drug interaction by chelation.

研究代表者

今岡 鮎子（Imaoka, Ayuko）

慶應義塾大学・薬学部（芝共立）・助教

研究者番号：10710957

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、キレート形成に起因する薬物相互作用に伴うアルミニウム（Al）吸収亢進について、各種細胞を用いて評価した。まず、消化管吸収モデル細胞による評価において、Al 吸収に対する抗菌薬の影響は、同じメカニズムにより相互作用を起こすニューキノロン系（NQs）とテトラサイクリン系で異なる可能性が示された。また、P 糖タンパク質（P-gp）過剰細胞による評価において、NQs のレボフロキサシンと Al のキレート体は P-gp 基質ではなく、脳血液関門において P-gp によるキレート体の排出は期待できないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルミニウム（Al）は過剰摂取するとアルツハイマー病などの神経変性疾患につながるといわれている。本研究結果より、ニューキノロン系抗菌薬と Al を併用した際には、P 糖タンパク質によるキレート体の排出は期待できず、Al は脳へ移行する可能性が高いことが示唆された。つまり、両者併用時には Al の脳への蓄積が促進され、神経変性疾患の発症リスクが上昇する可能性を示唆できたことから、本研究結果は臨床的意義がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we evaluated the increased aluminum absorption associated with drug interaction caused by chelation. In the evaluation using gastrointestinal absorption model cells, it was shown that the effect of antimicrobial drug on aluminum absorption may be different between new quinolone antibiotics (NQs) and tetracycline antibiotics (TCs) which interact with metal cations by same mechanism. In the evaluation using the P-glycoprotein (P-gp) overexpression cells, it was revealed the chelate between levofloxacin and aluminum was not the substrate of P-gp.

研究分野：臨床薬物動態学

キーワード：アルミニウム ニューキノロン系抗菌薬 テトラサイクリン系抗菌薬 キレート形成 消化管吸収 薬物相互作用

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬物の消化管吸収過程において生じる薬物相互作用は、最適な薬物治療の障壁となる。シプロフロキサシン (CPFX) に代表されるニューキノロン系抗菌薬 (NQs) やテトラサイクリン系抗菌薬 (TCs) は、アルミニウム (Al) やマグネシウム (Mg) などの金属カチオン含有制酸剤と併用すると、吸収が顕著に低下し、血中濃度が低下することは周知の事実である。実際に、両剤を併用した際に抗菌薬の薬効が発揮されず、感染症が悪化した症例も報告されている。この相互作用が起きるメカニズムとして、抗菌薬が金属カチオンとの間で難吸収性のキレートを形成すること、制酸剤に抗菌薬が吸着することが考えられており、現在、教科書や医薬品添付文書にもそのように記載されている。しかし、これまでに、実際にキレート形成や物理的吸着により消化管吸収が低下するか否か、*in vitro* における定量的な検討は行われておらず、そのメカニズムの詳細は解明されていなかった。また、抗菌薬の吸収が低下することは多く報告されているが、金属の吸収についての検討は行われていなかった。

我々は *in vitro* において本相互作用に関する検討を行うために、ヒト大腸がん由来培養上皮細胞 (Caco-2 細胞) による細胞単層膜を用いて、CPFX と Al によるキレートが形成した条件下で膜透過実験を行ってきた。その結果、CPFX の透過は最大 Al 濃度を併用しても、CPFX 単独時の 30% 程度が維持されていた。この知見は、CPFX と Al を同時に併用しても、CPFX は細胞単層膜を透過し、消化管からの吸収はゼロにはならず、臨床上報告されている CPFX 吸収の低下は、キレート形成によるものだけでは説明できないことを示唆するものである。一方で、このときの Al の細胞単層膜透過についても検討を行ったところ、CPFX 非存在下と比べて、CPFX 存在下において Al の吸収が 3~10 倍に亢進することを確認した。この知見により、長年通説とされてきた仮説を覆す可能性がもたらされた。具体的には、ほとんど腸管から吸収されない Al が、CPFX 存在下において吸収増大すること、難吸収性であるとされているキレート形成物が細胞単層膜と透過する可能性が示唆された。この現象は、レボフロキサシン (LVFX) を用いた検討においても観察されているが、このとき実際にどのように CPFX および LVFX と Al が透過したのか、また他の金属においても同様のことが再現されるのかは不明なままであった。

2. 研究の目的

消化管吸収モデル細胞、血液脳関門モデル細胞、各種トランスポーター過剰発現細胞を用いた包括的検討により、キレート形成に起因するとされている NQs や TCs と金属カチオンとの相互作用のメカニズムを明らかにし、体内への金属吸収亢進の可能性について明らかにすることを目的とした。

具体的には、NQs または TCs と金属カチオンのキレート形成条件下における NQs または TCs および金属カチオンの吸収特性を評価した。まず、Caco-2 細胞単層膜を用いて、代表的な NQs または TCs と金属カチオンによる膜透過実験を行い、抗菌薬透過の低下の程度、金属カチオンの透過の有無を評価することで、それぞれの透過特性やキレート形成物そのものの細胞単層膜透過の有無を検討した。次に、排出トランスポーターである P 糖タンパク質 (P-gp) の過剰発現細胞 (LLC-GA5-COL300 細胞) 等を用いた膜透過実験により、キレート形成物がトランスポーターの基質になるか否かを検討し、キレート体の細胞単層膜透過性のメカニズムやトランスポーターの寄与を評価した。以上の検討から、キレート形成に起因する相互作用のメカニズムと金属吸収の亢進の可能性について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) NQs および TCs と金属カチオンの Caco-2 細胞単層膜透過特性の定量的評価

自身が現在までに行ってきた、Caco-2 細胞による細胞単層膜透過実験と同様の方法で行った。すなわち、細胞単層膜形成の指標である膜抵抗が $800 \Omega \cdot \text{cm}^2$ に到達した Transwell® の apical 側に各薬剤の溶液を添加し、経時的に basal 側からサンプリングを行った。薬液は、 $100 \mu\text{M}$ テトラサイクリン (TC)、0, 30, 100, $500 \mu\text{M}$ Al³⁺ とした。各薬剤の濃度は、抗菌薬と金属カチオン含有製剤の臨床用量 mol 比とキレート形成 mol 比を考慮し、段階的に設定した。また、膜透過実験用溶液、各薬液の溶媒は、薬液に含まれる金属カチオンの影響を評価するため、Mg²⁺、Ca²⁺ 濃度を通常 10 分の 1 にした HEPES-Tris 液を調製し用いた。さらに、膜抵抗のほかに細胞単層膜形成に傷害がないことを確認するために、 1 mg/mL FITC-inulin をパラセルラーマーカーとして使用した。サンプル中の FITC-inulin は、蛍光光度法により定量し、みかけの透過係数 (P_{app}) を算出することにより、膜透過実験における単層膜の形成や実験の妥当性を評価した。また、TC は HPLC-UV 法により定量し、算出した P_{app} を用いて、TC 単独時と Al 併用時の透過量の差を定量的に評価した。さらに、Al 濃度は蛍光試薬であるルモガリオンを用いた蛍光光度法により定量した。Al の P_{app} を算出し、Al 単独時と抗菌薬併用時の透過量の差を定量的に評価し、Al の細胞単層膜透過特性を評価した。

(2) 各種トランスポーター過剰発現細胞を用いたキレート体の細胞単層膜透過性評価

基本的には、(1) の NQs および TCs と金属カチオンの Caco-2 細胞単層膜透過特性の定量的評価と同様の手法を用いて検討を行った。まず、P-gp に着目し、P-gp 過剰発現細胞 (LLC-GA5-COL300 細胞) とその親細胞 (LLC-PK1 細胞) を用いて膜透過実験を行った。両細胞をそれぞれ単層に培養した Transwell® の donor 側に各薬剤の溶液を添加し、経時的に receiver 側からサンプリングを行った。薬液は、30 μ M LVFX、0, 100 μ M Al³⁺ とした。Apical 側から basal 側 (A to B) および basal 側から apical 側 (B to A) の両者の透過量を定量し、得られた P_{app} から net efflux ratio を算出した。厚生労働省から発出されている「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン」に従って、net efflux ratio が 2 を超えたとき、P-gp の基質であると判断した。

4. 研究成果

(1) NQs および TCs と金属カチオンの Caco-2 細胞単層膜透過特性の定量的評価

TC の透過量は TC 単独時と比較して、Al 併用により Al³⁺ 濃度依存的に減少した (Figure 1)。また、TC の P_{app} は、Al 併用により最大 86% 低下し (Figure 2)、過去のヒト臨床試験報告と良好に対応していた。一方で、Al の透過は、TC を併用しても増大しなかった。NQs 存在下で Al の透過は亢進していたことから、キレート形成という同じメカニズムで相互作用を起こす抗菌薬でも、Al の挙動に対する影響はその種類により異なることが示唆された。また、Al の P_{app} は、TC 併用の有無にかかわらず、Al³⁺ 濃度依存的に低下した。このことから、Al の膜透過が高濃度域で飽和している可能性が示唆され、Al の膜透過には特殊輸送系が介在し、本研究で検討した濃度範囲においてその輸送能が飽和していると推測される。

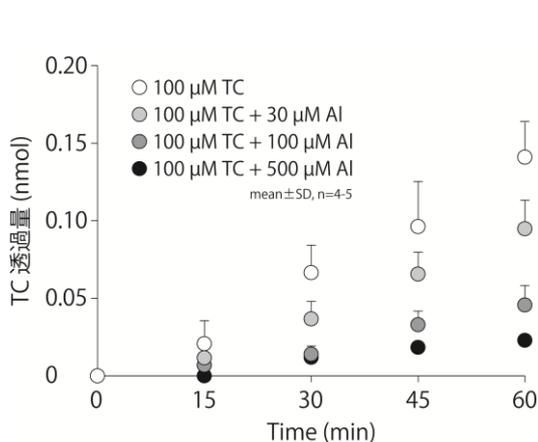


Figure 1 Al存在下におけるTCのCaco-2細胞単層膜透過量

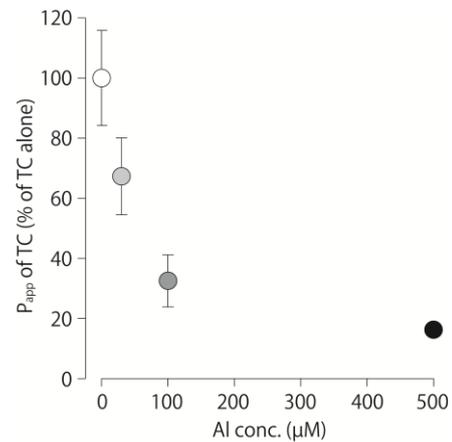


Figure 2 TCのP_{app}に及ぼすAlの影響
mean \pm SD, n=4-5

(2) 各種トランスポーター過剰発現細胞を用いたキレート体の細胞単層膜透過性評価

LLC-GA5-COL300 細胞において、LVFX は Al 存在下、非存在下のいずれにおいても、B to A 優位な方向性輸送がみられた (Figure 3)。一方、LLC-PK1 細胞では輸送の方向性はみられなかった (Figure 3)。両者併用時の LVFX、Al³⁺ の net efflux ratio はそれぞれ 2.48、0.94 であった。以上より、LVFX - Al³⁺ キレート体は P-gp 基質ではないことが示唆された。LVFX - Al³⁺ キレート体は細胞内で大部分が解離し、遊離型の LVFX のみが P-gp により輸送される一方で、Al³⁺ は受動拡散により細胞外に移行している可能性が考えられる。

アルツハイマー病などの神経変性疾患は、脳への Al の蓄積が関与することの報告もある。脳には薬物脳内移行を制限するための血液脳関門が存在し、P-gp が重要な役割を担っている。本結果より、両剤併用時には P-gp による Al の排出作用は期待できないことから、NQs と Al を併用した際には、Al の吸収増大や中枢移行性亢進に対する注意が必要であるといえる。

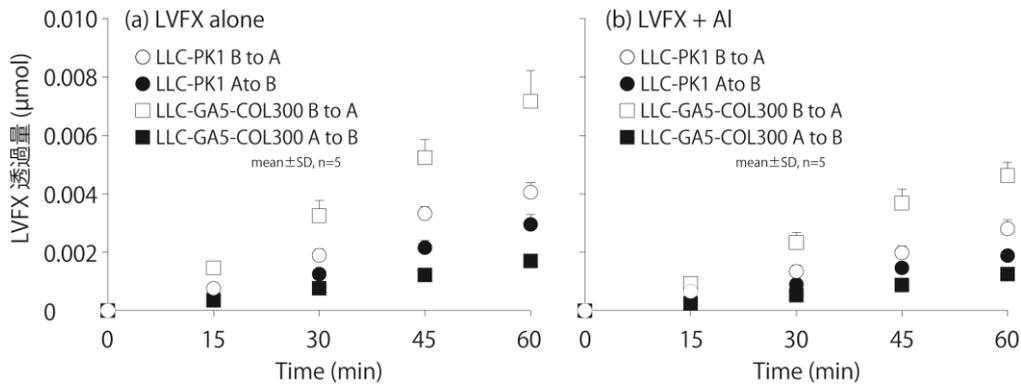


Figure 3 Al 存在下または非存在下における LVFX の LLC-PK1 または LLC-GA5-COL300 細胞単層膜透過量

(3) まとめ

本研究では、キレート形成に起因する薬物相互作用に関する新たなメカニズムの解明と、相互作用時の金属吸収亢進のリスクを検討することを目的に、NQs や TCs と Al などの金属カチオンを用いて、両者の細胞単層膜透過性を評価した。消化管吸収モデル細胞による評価では、Al 透過に対する抗菌薬の影響は、同じメカニズムにより相互作用を起こす NQs と TCs で異なる可能性が示された。

現在、Al 自体の吸収メカニズムは明らかになっていない。金属を細胞内に取り込むトランスporterとして、SLC ファミリーの **divalent metal transporter 1 (DMT1)** が報告されており、この DMT1 はドパミン神経変性に関与しているとの報告もある。今回の検討において、Al の膜透過に輸送担体の関与が示唆されたことから、今後は、このトランスporterにも着目し、Al の吸収メカニズムも共に検討していきたいと考えている。

また、P-gp 過剰発現細胞による評価では、NQs と Al のキレート体は P-gp 基質とならなかったことから、P-gp による Al の排出は期待できず、Al の中枢移行が亢進する可能性が示唆された。現在、血液脳関門モデル細胞による透過性の評価を実施しており、今後上記の可能性をより詳細に評価したいと考えている。

今後は、本研究成果をふまえ、上記の Al の吸収特性の解明と、NQs 併用時の Al の吸収亢進が生体レベルでもみられるのかを評価していきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武田愛美、今岡鮎子、秋好健志、大谷壽一
2. 発表標題 テトラサイクリンとアルミニウムの消化管上皮細胞単層膜透過と相互作用
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----